doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.006

共载依克立达和阿霉素的 PBM-Hz-PEG 纳米粒制备与性能研究*

李伟1 焦子熠2 罗 薇2 朴密洋2 吴 红2 乔友备24

(1中国人民解放军联勤保障部队第九四二医院药剂科 宁夏 银川 750001;2 空军军医大学药学系 陕西 西安 710032)

摘要目的:研究不同比例依克立达(ELC)和阿霉素(DOX)的联合抗肿瘤效果,确定最佳联用比例。以生物可降解材料聚苹果酸苄基酯(PBM)为载体包封两种药物,得到一种酸敏感纳米胶束。方法:以L-天冬氨酸为原料通过内酯开环法制备 PBM,并以酸敏感的腙键(Hz)连接 PEG,得到嵌段聚合物 PBM-Hz-PEG,红外光谱和核磁氢谱对其结构进行表征。动态透析法制备纳米胶束,测定纳米胶束的粒度、分散系数(PDI)、临界胶束浓度(CMC)及其载药量(DL)、包封率(EE)。动态透析法模拟胶束的体外释药性能,采用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系考察载药纳米胶束的体外细胞毒性。结果:0 ELC 能够增敏 DOX,二者摩尔比为 1:3 时有最强肿瘤抑制作用。0 经红外光谱和核磁共振氢谱表征,嵌段共聚物 PBM-Hz-PEG 成功合成。0 空白纳米胶束的粒径为 69.67±11.55 nm,PDI 为 0.245±0.026,CMC 值为 3.9 μg·mL⁻¹;载药纳米胶束粒径略大,粒径在 96.92~113.47 nm 之间,ELC 和 DOX 的载药量与投料比一致。0 载药纳米胶束在 pH 7.4 和 pH 6.0 时的药物释放率曲线和体外细胞毒性试验证实载药胶束具有良好的酸敏特性。结论:ELC 和 DOX 联用有较强的肿瘤抑制作用,PBM 是二者的优良载体。该 PBM-Hz-PEG 纳米胶束载药率高,其特有的酸敏性能够有效降低药物对正常组织的毒副作用,具有肿瘤组织富集释放特性,有望成为一种新型智能释药平台。

关键词:聚苹果酸苄基酯;依克立达;阿霉素;腙键

中图分类号:R-33;R945;R730.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)11-2028-07

Preparation and Properties of PBM-Hz-PEG Nanoparticles Co-loaded with Elacridar and Doxorubicin*

LI Wei', JIAO Zi-yr, LUO Wer, PIAO Mi-yang, WU Hong, QIAO You-ber2

(1 Pharmacy Department, the 942 Hospital of the joint logistics support force of the PLA, Yinchuan, Ningxia, 750001, China; 2 School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the anti-tumor effect of different proportions of elacridar (ELC) and doxorubicin (DOX), and determine the best combination ratio. Preparing a new type of acid-sensitive nanoparticles co-loaded with ELC and DOX using poly (benzyl malate) (PBM) as a carrier. Methods: PBM was prepared from L-aspartic acid by lactone ring opening method, then PEG was linked with acid sensitive hydrazone bond (Hz). The block polymer PBM-Hz-PEG was obtained and characterized by IR and 1H NMR. The nano micelles were prepared by dynamic dialysis. The particle size, polydispersity index (PDI), critical micelle concentration (CMC), drug loading capacity (DL) and entrapment efficiency (EE) of nano micelles were determined. Dynamic dialysis method was used to simulate the drug release performance in vitro for the drug loaded nano micelles. The cytotoxicity of the drug loaded nano micelles was evaluated by triple negative breast cancer MDA-MB-231 cell line in vitro. Results: 0 ELC can enhance the sensitivity of DOX. They have the strongest antitumor effect when the molar ratio of ELC and DOX is 1:3. 0 The results of IR and 1H NMR showed that the block copolymer PBM-Hz-PEG was successfully synthesized. 0 The particle size of the blank micelles was 69.67±11.55 nm, the PDI was 0.245±0.026, and the CMC value was 3.9 µg·mL⁻¹. The particle size of drug loaded nano micelles was slightly larger, ranging from 96.92 nm to 113.47 nm. The drug loading of ELC and DOX was consistent with the feed ratio. 0 The drug release rate curves and cytotoxicity tests in vitro of drug loaded micelles at pH 7.4 and pH 6.0 confirmed that the drug loaded micelles had good acid sensitivity. Conclusions: The combination of ELC and DOX has strong antitumor effect, and the PBM is an excellent carrier for both. The PBM-Hz-PEG nanomicelles have high drug loading rate, and their unique acid sensitivity can effectively reduce the toxicity of drugs on normal tissues and significantly increase the release of tumor tissues, which is expected to become a new intelligent drug delivery platform.

Key words: Poly (benzyl malate); Elacridar; Doxorubicin; Hydrazone bond Chinese Library Classification(CLC): R-33; R945; R730.5 Document code: A Article ID:1673-6273(2021)11-2028-07

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81571786;31771087)

作者简介:李伟(1985-),男,硕士,主管药师,研究方向:纳米药物,电话:15769503737,E-mail:418267792@qq.com

[△] 通讯作者:乔友备,男,博士,讲师,研究方向:肿瘤靶向纳米药物,电话:029-84776827,E-mail: youbei08@163.com

⁽收稿日期:2020-11-28 接受日期:2021-01-05)

前言

糖蛋白(P-gp)是由 MDP1 基因表达的一种膜蛋白,它在 肿瘤细胞的过表达导致肿瘤对多种化疗药物(如蒽环类、紫杉 类等)产生耐药性(Muti-drug resistance, MDR),是造成化疗失 败的主要原因^[1-3]。依克立达(Elacridar, ELC)是第三代 P-gp 抑 制剂的代表性药物,可竞争性结合 P-gp,抑制 P-gp 对药物的外 排^[46]。理论上,ELC 与抗肿瘤药物联合使用可增强肿瘤细胞对 化疗药物的敏感性,有望成为肿瘤治疗的优势组合。但是,临床 研究者将游离 ELC 与阿霉素(DOX)、紫杉醇、多西他赛等常见 化疗药物联用,却未见明显疗效^[4],主要是因为普通的联用策略 采用 "鸡尾酒式 " 给药方案,即将两种或多种药物进行物理混 合后给药。该策略虽然简单,但存在很大缺陷:不同药物的药代 动力学、组织分布和细胞膜穿透能力不同,导致肿瘤部位的药 物摄取不一致,难以达到最佳药物协同比例,故而导致肿瘤治 疗联用策略的失败^[79]。此外,ELC 和 DOX 均为小分子,全身给 药时的系统毒性、缺乏靶向性是制约其治疗效果的重要因素。

纳米药物运载体系(Drug delivery system)能够实现两种药物的共递送,并可借助肿瘤组织的主/被动靶向效应,使药物在肿瘤部位高效富集,在逆转肿瘤多药耐药方面表现出极大的潜在价值^[10-13]。

本研究选用乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系,通过体外细胞 试验确定二者最佳联用比例,并以酸敏感的嵌段聚合物 PBM-Hz-PEG 为载体,将二者包封,得到抗肿瘤纳米胶束。考察 ELC 和 DOX 投料比例对纳米胶束载药量和包封率的影响,确 定最佳胶束制备条件,并对所制备胶束进行表征。考察不同 pH 条件下纳米胶束的药物释放性能以及细胞毒性。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

全自动酶标仪(Thermo FC,美国赛默飞世尔),二氧化碳细 胞培养箱(HERAcell 240i,美国赛默飞世尔),电子分析天平 (ME104E,美国梅特勒托利多仪器公司),台式离心机(Souvall ST 40R,美国赛默飞世尔),傅里叶变换红外光谱仪(IRAffinity-1S,日本岛津),核磁共振仪(AVANCE III HD 400M,德国布 鲁克),纳米粒度电位分析仪(Delsa Nano C,美国贝克曼),液相 色谱仪(Agilent 1260,美国安捷伦),透射电镜(Tecnai? G2 SPIRIT BioTWIN,美国 FEI),荧光分光光度计(RF-6000,日本 岛津)。

DOX,北京华奉联博;ELC,阿拉丁试剂;1-乙基-3-(3-二 甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰 亚胺(NHS)等均购自 Sigma;其他试剂均由国药集团提供。细 胞系(MDA-MB-231)购自上海中乔新舟生物科技有限公司; CCK-8、ZETA life、细胞培养液、血清、胰酶等均购自 Gibco。 PBM,实验室自制。

1.2 ELC 和 DOX 联合抑制肿瘤活性研究

使用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 作为受试细胞,考察 ELC 和 DOX 联合抑制肿瘤的效果。将对数生长期的 MDA-MB-231 制成 5×10³个 / 孔的细胞悬液,按每孔 100 µL 接种到 96 孔板上,37 ℃孵育 24 h 待细胞贴壁后弃去培养液, 按照设定浓度梯度(单纯 ELC 组自 320 µmol·mL⁻¹起,三倍比稀释;其他组自 120 µmol·mL⁻¹起,三倍比稀释)加入含有不同 比例 ELC 和 DOX 的培养液,每种浓度设 5 个复孔,并设对照 组和空白组。48 h 后弃去培养液,加入 100 µL 含 10% CCK-8 的无血清培养液,37 ℃孵育 3 h 后用酶标仪测定在 450 nm 处 的吸光度,计算细胞生存率,绘制细胞生存率 - 浓度曲线图,并 计算半数抑制浓度 IC₈₀,确定二者最佳联用比例。

细胞生存率 (%)=<u>实验组 OD 值 - 空白组 OD 值</u> ×100 % 对照组 OD 值 - 空白组 OD 值 ×100 %

1.3 PBM-Hz-PEG 的合成及表征

参考文献方法^[4],以L-天冬氨酸为原料通过内酯开环法 制备聚苹果酸苄基酯(PBM)。

参考文献方法^[13,15]合成 PBM-Hz-PEG:称取 PBM 224 mg (Mw 5 kDa) 溶于 15 mL DMSO 中,加入 0.2 mmol NHS 和 0.3 mmol EDCoHCl,搅拌使之溶解,室温下反应 6 h,活化 PBM 链 端羧基。之后加入 0.3 mmol 水合肼,反应 6 h 后再加入 1 mmol NH2-PEG5k,室温下继续反应 6 h,得 PBM-Hz-PEG。完毕后先 使用 DMSO 透析 24 h,MWCO 5 kDa;再使用去离子水透析 48 h。冷冻干燥即得 PBM-Hz-PEG,产物为白色絮状固体。

将少量聚合物冻干粉末与干燥的溴化钾混匀,研磨均匀后 压片,使用红外光谱仪测定聚合物的红外光谱性质(扫描范围 400~4000 cm⁻¹,测定前使用空白溴化钾片调整扣除背景吸 收)。将两组嵌段聚合物溶于氘代 DMSO 中,测定其核磁共振 氢谱 1H-NMR,以四甲基硅烷为内标。

1.4 纳米胶束的制备

使用动态透析法制备聚合物纳米胶束:10 mg PBM-Hz-PEG 聚合物溶于 2 mL DMSO 中,加入 2 mg 设定比例的 DOX 和 ELC,避光环境下磁力搅拌 2 h。随后逐滴加入 0.5 mL 去离 子水,超声分散 30 s 后再继续搅拌 30 min。将以上溶液转移至 透析袋(MWCO 50 kDa)中,4℃下透析 48 h 即得胶束。若长期 保存,需将胶束溶液冻干,得橙红色絮状固体,使用时用去离子 水或 PBS 溶解,超声分散即可。根据药物毒性试验结构,设定 DOX 和 ELC 的投料摩尔比在 1:1~1:5,考察 DOX 和 ELC 的 投药比对两种药物载药量(Drug loading,DL)和包封率(Encapsulation efficiency,EE)的影响,以此进行载药条件的优化。

空白胶束(不载药)的制备方法相同,不加入 DOX 和ELC。

1.5 纳米胶束的表征

使用纳米粒度分析仪测定所得纳米胶束的粒度和分散系数。样品浓度约为 0.1 mg·mL⁻¹,温度为 25 ℃。

将纳米胶束溶液滴加在 230 目碳支持膜铜网上,室温下挥 干溶剂后使用透射电镜观察所得纳米胶束的形貌,电压 80 kV。

使用芘荧光探针法测定空白胶束的临界胶束浓度(Critical micelle concentration, CMC),配制系列浓度(1.0×10⁻⁵ mg·mL⁻¹ ~ 0.5 mg·mL⁻¹)的胶束溶液,室温下避光静置过夜,之后使用荧光分光光度计测定各溶液的荧光强度,激发波长 334 nm,发射 波长 300~500 nm。以浓度为横坐标,373 nm (I373)与 383 nm (I383)处荧光值之比为纵坐标作图,计算空白胶束的 CMC 值。由于 ELC 和 DOX 的荧光信号和芘的荧光信号有重叠,故未测 定载药胶束的 CMC 值。

1.6 载药胶束的载药量和包封率测定

称取 5 mg 载药胶束,溶于 1 mL DMSO 中,使 DOX 和 ELC 充分游离。之后使用高效液相色谱仪测定 DOX 和 ELC,标准曲线法计算两种药物的含量,并计算载药纳米胶束的载药量(DL)和包封率(EE)。

计算公式如下:

载药量(%)=<u>胶束中药物的质量</u>×100% 胶束的质量 包封率(%)=<u>胶束中药物的质量</u>×100% 投药量

色谱分析条件为:色谱柱:CAPCELLPAK C18(3 μm,100 mm × 3 mm);流动相:25 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠溶液(pH 4.0): 乙腈(60:40);流速:0.8 mL·min⁻¹;DAD 检测器,257 nm;进样 量:20 μL;柱温:25 ℃。

1.7 体外药物释放研究

使用动态透析法模拟胶束的体外释药性能。将含有载药胶 束溶液的透析袋(MWCO2kDa)置于不同 pH PBS 缓冲液(pH 7.4,6.0)中,37℃恒温震荡,100 rpm。设定时间间隔内取一定量 透析袋外液,并加入等体积相同 pH PBS 缓冲液。使用高效液 相色谱法测定其中 DOX 和 ELC 的含量,绘制药物释放-时间 曲线。

1.8 载药纳米胶束的体外细胞毒性研究

使用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 作为受试细胞,CCK-8 法考察载药纳米胶束的体外细胞毒性。将对数生长期的 MDA-MB-231 制成 5×10³ 个/孔的细胞悬液,按每孔 100 μL 接种至 96 孔板上, 37 ℃孵育 24 h 待细胞贴壁后弃去培养液, 按照设定浓度梯度(120 μmol·mL⁻¹~18 nmol·mL⁻¹)加入含有 不同浓度载药纳米胶束的培养液,分别调节含药培养基的 pH 为 7.4 和 6.0,每种浓度设 5 个复孔,并设对照组和空白组。48 h 后弃去培养液,加入 100 μL 含 10% CCK-8 的无血清培养液, 37 ℃孵育 3 h 后用全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,计 算细胞生存率,绘制生存率-浓度曲线图。

相同方法测定空白胶束的细胞毒性。

1.9 统计学分析

所有结果均为平均值±SD。平均值是每组中至少三个重复的平均值。使用单因素方差分析和 Student's t 检验进行统计学分析, P<0.05 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 ELC 和 DOX 联合抑制肿瘤活性研究

DOX 是常用广谱抗肿瘤药物,对多种肿瘤细胞均有良好的抑制作用;ELC 是 P-gp 抑制剂,同时也具有抗肿瘤效果。二者的 IC50 分别为 13.98 μmol·L⁻¹和 0.70 μmol·L⁻¹。由图 1 可见,ELC 的加入能够极大增加 DOX 的细胞毒性,ELC 和 DOX 比例在 1:1~1:5 范围内的细胞毒性均比单独 DOX 强,IC₅₀ 降低约 2~4倍,摩尔比为 1:3 时有最强的细胞抑制作用,IC₅₀为 0.18 μmol·L⁻¹,比 DOX 低 3.9 倍。因此,ELC 和 DOX 联合使用具有良好的协同作用,能够更有效的抑制肿瘤细胞生长。





Fig.1 CCK-8 was used to determine the cytotoxicity of ELC, DOX and their combination in different proportions, 48 h, 37 °C, MDA-MB-231 Cell line

2.2 PBM-Hz-PEG 的表征

使用红外光谱法(溴化钾压片)对嵌段聚合物 PBM-Hz-PEG5k进行表征(图2A),741 cm⁻¹、698 cm⁻¹和3030~ 3080 cm⁻¹处为苯环伸缩振动;3300 cm⁻¹处为 PBM 链端的羧 基,与 PEG 或其他基团链接后强度降低或消失。图2B 是嵌段 聚合物的核磁共振氢谱,各特征峰归属已用字母在图上标注。 综合红外和核磁图谱,证实嵌段聚合物的合成是成功的。

2.3 聚合物胶束的表征

空白纳米粒为均匀体系,略不透明,有明显丁达尔现象;载 药胶束为橙红色均匀体系,无沉淀产生。动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)测定所得纳米胶束的粒径为 69.67±11.55 nm,分散系数(Polydispersity index, PDI)为 0.245±0.026,载药 纳米胶束的粒径比空白胶束大,根据包载 ELC 和 DOX 的比例 不同,粒径在 96.92~113.47 nm 之间,分散系数为 0.169~

0.232,图3。





使用透射电镜(Transmission electron microscope, TEM)观察所得胶束的形貌,所有胶束均为球形结构,形貌圆整,分布均匀,分散性良好,图4。与 DLS 数据相比,TEM 观测到的胶束粒径较小,这是因为 DLS 测定的是胶束在水溶液中的状态,胶束的外层是 PEG,使胶束外层多了水化层;而 TEM 测定时胶束则是干燥状态。

两亲性物质在溶剂中缔合形成胶束的最低浓度被称为临 界胶束浓度(CMC),是表征胶束的重要参数。诺荧光探针法测 定 PBM-Hz-PEG 胶束的 CMC 值为 3.9 μg·mL⁻¹(图 5),该嵌段 聚合物形成胶束的 CMC 值远低于两亲性小分子;较低的 CMC 能够保证嵌段聚合物在水相中形成胶束并在体循环期间保持 完整性和稳定性,赋予胶束较强的可稀释性。

2.4 载药胶束的载药量和药物包封率

用 DMSO 将胶束结构破坏后使 DOX 和 ELC 游离,使用 高效液相色谱法(HPLC)测定其中 DOX 和 ELC 含量。不同药 物投放比例所制备胶束的载药量和药物包封率见表 1。结果表 明,制备时加入不同比例的 ELC 和 DOX 得到的载药胶束能够 基本保持按投料比例载药,总载药量均在 13%左右。而 PBM-Hz-PEG 胶束单独包载 DOX 时载药量则高达 20%,高于 其他聚酯 -PEG 胶束(聚乳酸 -PEG,聚己内酯 -PEG)包封 DOX 的载药量,主要是由于 ELC 和 DOX 都有多元芳环结构,能够 与 PBM 结构单元中的苯环形成 π-π 堆积作用,有利于提高药 物的包载^[13,15]。结合游离 ELC 与 DOX 体外细胞毒性实验结果 (2.1),我们采用 ELC 与 DOX 为 1:3 的投料比制备的胶束进行 后续体外药物释放和生物学性质考察。

2.5 体外药物释放性能



图 4 胶束的透射电镜图(比例:100 nm) Fig.4 Transmission electron microscopy of micelles (Scale bar: 100 nm)



图 6 是载药纳米胶束在不同 pH 条件下的释药曲线。从 图中可以看出,在生理 pH(pH 7.4)时,胶束中的药物很少释 放,72 h 时最大累积释放率不超过 20%。在低 pH(pH 6.0)时, 由于 PBM-Hz-PEG 中酸敏的腙键断裂,促使胶束解体,从而使 药物的释放率明显增加,72 h 两种药物的累积释放率均超过 70%。由于腙键的引入,使胶束具有酸敏感释放性能,这意味着 纳米胶束进入体循环中(pH 7.4)能够保持较好的稳定性,一旦 达到病灶部位,就会响应肿瘤部位的弱酸环境(pH 6.0 或更低) 将负载的药物释放出来,发挥其抗肿瘤作用。并且,在释放过程 中两种药物的释放速度基本保持一致,这有利于两种药物保持 最佳配比发挥协同抗肿瘤作用。

2.6 载药胶束的细胞毒性

采用 CCK-8 试剂盒通过体外细胞实验考察载药纳米胶束 的细胞毒性。空白纳米胶束的细胞生存曲线见图 7,在50~ 1000 μg·mL⁻¹范围内 PBM-Hz-PEG 空白胶束没有表现出明显 的细胞毒性,说明对聚苹果酸进行疏水化修饰也不会增加其细 胞毒性,该胶束的安全性较高。载药纳米胶束和游离药物在不 同 pH 条件下的细胞毒性见图 8,在 pH 7.4 时,载药纳米胶束的 细胞毒性明显降低,IC₅₀约为 553 μmol·mL⁻¹,这是由于此时胶 束较稳定,药物被包封于胶束内核,不易泄露,故其细胞毒性很 低。在 pH 6.0 时,由于聚合物 PBM-Hz-PEG 中腙键断裂,胶束 解体,药物大量释放,肿瘤细胞的被杀死,IC₅₀大幅降至 3.78 μmol·mL⁻¹。游离药物则具有更强的细胞毒性,其在不同 pH 条 件下的 IC₅₀在 0.17~0.34 μmol·mL⁻¹之间,没有 pH 响应,这是 由于药物直接作用于细胞,能更快速的进入细胞,发挥协同抗 肿瘤作用。但是,游离药物单独给药缺乏靶向性,对正常组织的 毒副作用较大,纳米给药体系则能够通过被动靶向作用使药物

Table 1 DL and EE of incenes prepared by different drug derivery fattos				
ELC: DOX	ELC		DOX	
	DL(%)	EE(%)	DL(%)	EE(%)
1:1	6.65 ± 0.17	78.39±11.68	6.43±0.10	78.57±3.22
1:2	5.05 ± 0.09	88.72±10.14	8.79 ± 0.08	80.10±5.28
1:3	3.26 ± 0.08	76.11±8.51	9.65±0.15	77.93 ± 8.13
1:4	3.01±0.12	87.67±6.76	10.1±0.06	75.64±2.89
1:5	2.42 ± 0.10	84.42±11.85	11.20±0.15	81.16±5.45

表1不同药物投放比例所制备胶束的载药量、包封率



Fig.6 Drug release curves at different pH, 72 h, 37 °C



Concentration (µg/mL)

图 7 空白胶束的细胞毒性,48 h,37 ℃,MD-MBA-231 细胞系 Fig.7 Cytotoxicity of blank micelles, 48 h, 37 ℃, MD-MBA-231 Cell line

在肿瘤组织富集,降低对正常组织的毒副作用。

3 讨论

近年来,聚合物纳米递药系统成为肿瘤靶向治疗的研究热 点^[1618],特别是根据肿瘤组织微环境设计的刺激响应型聚合物 纳米递药系统,可有效提高纳米粒在肿瘤组织的穿透性和肿瘤 细胞的摄取量,从而使药物在肿瘤组织和肿瘤细胞富集,提升 药物抗肿瘤效果,并显著降低药物对正常组织的毒副作用^[19]。 众多研究者致力于开发一种同时具备生物相容性好、生物可降 解、纳米胶束粒径小、载药量高、血液循环时间长、肿瘤微环境 响应等优点的聚合物纳米递药系统。

聚苹果酸(PMLA)及其衍生物具有良好的生物相容性和 生物可降解性,它在体内可以降解为苹果酸,苹果酸可以直接 进入人体三羧酸循环(TCA cycle),并降解为水和二氧化碳,不 会造成累积毒性,也没有免疫原性,是理想的药物载体材料[20-23]。 本研究以聚苹果酸疏水性衍生物 PBM 为载体,通过酸敏感的 腙键连接 PEG,得到嵌段聚合物 PBM-Hz-PEG,并制备成纳米 胶束。由于 PBM 主链上的苯环能够与 ELC 和 DOX 结构中的 芳环形成 π-π 堆积作用,有利于药物包载,提高了纳米胶束的 载药量;同时,研究结果显示,ELC和DOX能够按照投料比共 同包封于胶束内部,药物释放率也基本一致,这有利于制备出 最佳载药比的胶束,为更好的发挥两种药物的协同作用奠定了 基础。体外释药试验和体外细胞毒性试验显示,在 pH 7.4 时 (正常组织),胶束较为稳定,药物释放量小,细胞毒性小;在 pH 6.0时(肿瘤组织),腙键断裂,胶束解体,药物游离出来,细胞毒 性作用显著增强。综上,本研究制备的纳米药物运载体系兼具 生物相容性好、生物可降解、稳定性好、载药量高、肿瘤微环境 响应等优点,该体系有望成为一种新型智能释药平台。



图 8 CCK-8 法测定载药纳米胶束在不同 pH 时的抗肿瘤作用,48 h,37 °C, MD-MBA-231 细胞系 Fig.8 Determination of antitumor effect of drug loaded micelles at different pH by CCK-8 method, 48 h, 37 °C, MD-MBA-231 Cell line

参考文献(References)

- Traxl A, Wanek T, Mairinger S, et al. Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Influence In Vivo Disposition of 11C-Erlotinib[J]. J Nucl Med, 2015, 56(12): 1930-1936
- [2] Kou L, Sun R, Bhutia Y D, et al. Emerging advances in P-glycoprotein inhibitory nanomaterials for drug delivery [J]. Expert Opin Drug

Deliv, 2018, 15(9): 869-879

- [3] Dallavalle S, Dobricic V, Lazzarato L, et al. Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors[J]. Drug Resist Updat, 2020, 50: 100682
- [4] Planting A S, Sonneveld P, Van der Gaast A, et al. A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in

combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55(1): 91-99

- [5] Han M, Lv Q, Tang X J, et al. Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoaminehyaluronic acid complex[J]. J Control Release, 2012, 163(2): 136-144
- [6]杨佳,程丽芳,杨书,等.多柔比星与依克立达联载纳米粒逆转乳腺 癌多药耐药的体外评价[J].中国药学杂志,2016,51(05):379-385
- [7] Baghbani F, Moztarzadeh F. Bypassing multidrug resistant ovarian cancer using ultrasound responsive doxorubicin/curcumin co-deliver alginate nanodroplets [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 153: 132-140
- [8] Zhang J, Li J, Shi Z, et al. pH-sensitive polymeric nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and curcumin to treat cancer via enhanced pro-apoptotic and anti-angiogenic activities [J]. Acta Biomater, 2017, 58:349-364
- [9] Zhu F, Tan G, Zhong Y, et al. Smart nanoplatform for sequential drug release and enhanced chemo-thermal effect of dual drug loaded gold nanorod vesicles for cancer therapy [J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17(1): 44
- [10] Tang X, Zhou S, Tao X, et al. Targeted delivery of docetaxel via Pi-Pi stacking stabilized dendritic polymeric micelles for enhanced therapy of liver cancer [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 75:1042-1048
- [11] Zhao G, Long L, Zhang L, et al. Smart pH-sensitive nanoassemblies with cleavable PEGylation for tumor targeted drug delivery [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3383
- [12] Zhou Q, Zhang L, Yang T, et al. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy [J]. Int J Nanomed, 2018, 13: 2921-2942
- [13] Qiao Y, Wang C, Liu B, et al. Enhanced Endocytic and pH-Sensitive Poly(malic acid) Micelles for Antitumor Drug Delivery [J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15(1): 28-41
- [14] Qiao Y B, Duan X, Fan L, et al. Synthesis of controlled molecular

weight poly (beta-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier [J]. J Polym Res, 2014, 21(4): 397

- [15] Qiao Y, Zhang C, Wang C, et al. MMP-2 sensitive poly (malic acid) micelles stabilized by π-π stacking enable high drug loading capacity [J]. J Mater Chem B, 2020, 8(37): 8527-8535
- [16] Mandal A, Bisht R, Rupenthal I D, et al. Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies[J]. J Control Release, 2017, 248: 96-116
- [17] Zhang F, Ni Q, Jacobson O, et al. Polymeric Nanoparticles with a Glutathione-Sensitive Heterodimeric Multifunctional Prodrug for In Vivo Drug Monitoring and Synergistic Cancer Therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(24): 7066-7070
- [18] Ali E S, Sharker S M, Islam M T, et al. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives [J]. Semin Cancer Biol, 2020, DOI: 10.1016/j.semcancer. 2020.01.011
- [19] Huang X, Liao W, Zhang G, et al. pH-sensitive micelles self-assembled from polymer brush (PAE-g-cholesterol)-b-PEG-b-(PAE-g-cholesterol) for anticancer drug delivery and controlled release[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 2215-2226
- [20] Venkatraj N, Nanjan M J, Loyer P, et al. Poly (malic acid) bearing Doxorubicin and N-Acetyl Galactosamine as a site-specific prodrug for targeting hepatocellular carcinoma [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2017, 28(10-12): 1140-1157
- [21] Zhou Q, Hou Y, Zhang L, et al. Dual-pH Sensitive Charge-reversal Nanocomplex for Tumor-targeted Drug Delivery with Enhanced Anticancer Activity[J]. Theranostics, 2017, 7(7): 1806-1819
- [22] Guo S, Zhou Q, Yang T, et al. Optimal Design of Novel Functionalized Nanoconjugates Based on Polymalic Acid for Efficient Tumor Endocytosis with Enhanced Anticancer Activity[J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(6): 1039-1051
- [23] Qiao Y, Liu B, Peng Y, et al. Preparation and biological evaluation of a novel pH-sensitive poly (beta-malic acid) conjugate for antitumor drug delivery[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(6): 3495-3502